PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/48259**
G01N 15/02	**A1**	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02239

(22) Internationales Anmeldedatum: 16. April 1998 (16.04.98)

(30) Prioritätsdaten:
197 17 749.2 21. April 1997 (21.04.97) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: KÖLBLIN, Rüdiger [DE/DE]; Heerstrasse 84, D-70563 Stuttgart (DE). GRIMME, Ralf [DE/DE]; Meisenweg 5, D-74385 Pleidelsheim (DE).

(74) Anwalt: PFENNING MEINIG UND PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

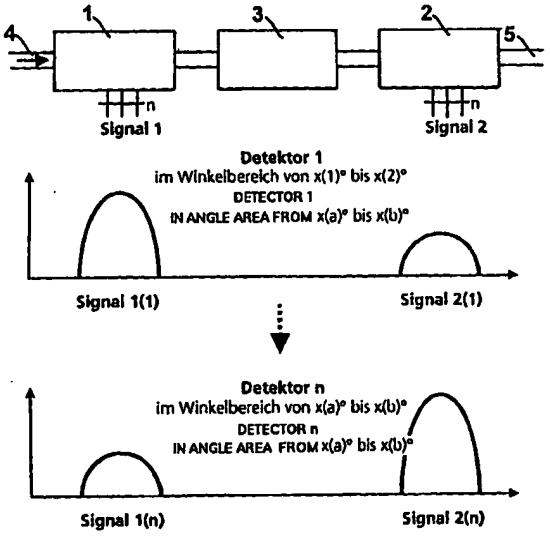
Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ON-LINE DIFFERENTIATION OF BIOTIC AND ABIOTIC PARTICLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR QUANTITATIVEN UND QUALITATIVEN ON-LINE-DIFFERENZIERUNG VON BIOTISCHEN UND ABIOTISCHEN PARTIKELN

(57) Abstract

The invention relates to a method and a device for quantitative and qualitative on-line differentiation of biotic and abiotic particles. Said methods and devices are used to ensure quality and to monitor production as well as in analysis procedures for particular contamination's of gaseous media. Said methods and devices are chiefly used in pharmacology, food technology, medicine, biotechnology and health care and in controlling maximum admissible concentration values. According to the inventive method, the gas sample to be measured is briefly heated at very high temperatures in a heating chamber (3). Dimensional distribution of particle contamination is determined before and after heating by means of diffuse light sensors (1, 2). Dimensional changes of biotic particles caused by heating make it possible to determine their proportion in total particle load of the gas sample and their composition.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur quantitativen und qualitativen on-line-Differenzierung von Partikeln. Derartige Verfahren und Vorrichtungen werden zur Qualitätssicherung und Produktionsüberwachung sowie als Analyseverfahren für partikuläre Kontaminationen in gasförmigen Medien eingesetzt. Sie werden insbesondere im Bereich der Pharmazie, Lebensmitteltechnik, Medizintechnik, Biotechnologie, im Gesundheitswesen sowie zur Überwachung von MAK-Werten verwendet. Das Verfahren besteht in einer kurzzeitigen Erhitzung der zu vermessenden Gasprobe auf sehr hohe Temperaturen in einer Erhitzungskammer (3) und der Bestimmung der Größenverteilung der Partikelkontaminationen vor und nach dieser Erhitzung mittels Streulichtdetektoren (1, 2). Die durch die Erhitzung verursachte Größenveränderung der Partikel biotischen Ursprungs erlauben die Bestimmung ihres Anteils an der Gesamtpartikelbelastung der Gasprobe und ihrer Zusammensetzung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren und Vorrichtung zur quantitativen und qualitativen on-line-Differenzierung von biotischen und abiotischen Partikeln

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur quantitativen und qualitativen on-line-Differenzierung von biotischen und abiotischen Partikeln.

Derartige Verfahren und Vorrichtungen werden zur Qualitätssicherung und Produktionsüberwachung sowie als Analyseverfahren für partikuläre Kontaminationen in gasförmigen Medien eingesetzt. Sie werden insbesondere im Bereich der Pharmazie, Lebensmitteltechnik, Medizintechnik, Biotechnologie, im Gesundheitswesen sowie zur Überwachung von MAK-Werten verwendet.

In diesen Bereichen spielt die biotische partikuläre Kontamination, insbesondere lebende partikuläre Kontaminationen wie zum Beispiel Luftkeime, in gasför-

migen Medien wie zum Beispiel Umgebungsluft oder einer Inertgasatmosphäre eine besondere Rolle für die Qualität des Produktes bzw. für die Sicherheit des Produktionspersonals oder des Endverbrauchers und daher ist die Überwachung der Reinheit dieser gasförmigen Medien eine absolute Notwendigkeit und wird in den meisten Fällen zwingend vom Gesetzgeber vorgeschrieben.

Fig. 1 zeigt die prinzipielle Einteilung der partikulären Kontaminationen in gasförmigen Medien in Partikel biotischen Ursprungs sowie abiotischen Ursprungs. Die Partikel biotischen Ursprungs können weiter unterteilt werden in lebende bzw. bereits tote Partikel. Als tote Partikel treten insbesondere tote Mikroorganismen oder Bruchstücke davon, Hautteile, Produktionsrückstände sowie Haare, Schweiß oder Hautfett auf. Die noch lebenden Partikel biotischen Ursprungs bestehen größtenteils aus Mikroorganismen wie Pilzen oder Bakterien (Luftkeimen) oder auch aus Keimen oder Sporen von Pflanzen.

Innerhalb von sterilen Produktionen müssen dabei die von der Federal Drug Administration, von der Good Manufacturing Practices-Richtlinie oder dem Blatt 3 der VDI-Richtlinie 2083 vorgeschriebenen besonders strengen Grenzwerte für Partikel biotischen Ursprungs eingehalten werden. Diese Grenzwerte sind in Fig. 2 dargetellt. Durch diese Richtlinien werden weiterhin die Verfahren zur Bestimmung von Luftkeimzahlen vorgeschrieben.

Die nachfolgenden Verfahren beschreiben den Stand der Technik zur Bestimmung von lebenden partikulären Kontaminationen im gasförmigen Medien.

Sedimentation

Bei diesem Verfahren werden Agarplatten in der zu vermessenden Atmosphäre offen ausgelegt. Anschließend werden die absedimentierten Mikroorganismen bestimmt. Eine Spezifizierung kann durch die Verwendung von Selektivnährböden erreicht werden.

Filtration

Bei diesem Verfahren werden die in einem Gasvolumen enthaltenen Keime bzw. Keimverbände auf einem Filter abgeschieden, der von dem Gas durchströmt wird. Die Filter werden anschließend direkt auf einem geeigneten Nährboden aufgebracht. Alternativ kann die Filtermembran in einer sterilen physiologischen Nährlösung aufgelöst und diese anschließend gefiltert werden. Das Material der Membran ist zumeist Gelatine oder Celluloseester. Dieses quantitative Meßverfahren wird insbesondere bei sehr hohen Keimzahlen bzw. bei einer gleichzeitigen Überprüfung der Keime auf unterschiedlichen Selektivnährböden eingesetzt.

Trägheitsabscheidung

Bei dieser Gruppe von Verfahren werden die Keime in verschiedenen Materialien, beispielsweise in Flüssigkeiten oder auf festen Nährböden abgeschieden. Ein Beispiel für ein derartiges Verfahren ist das Abscheiden der Keime mittels Glas-Impinger. Dieses Verfahren arbeitet nach dem Bubbler-Prinzip, in dem die zu vermessende Luft mit einer hohen Strömungsgeschwindigkeit durch eine Flüssigkeit geleitet wird. Die Luftkeime werden in der Flüssigkeit zurückgehal-

ten und die restliche Luft entweicht in Form von Blasen. Aufgrund der hohen Luftgeschwindigkeiten muß der Flüssigkeit Antischaummittel zugesetzt werden. Zur Vermeidung einer ungewollten Vermehrung der Luftkeime in der Flüssigkeit ist eine zügige Weiterverarbeitung unerläßlich.

Bei der Abscheidung auf festen Nährböden unterscheidet man zwischen Zentrifugalsammlern, Siebsammlern, Schlitzsammlern bzw. der Elektropräzipitation. Bei den Zentrifugalsammlern wird ein definiertes Luftvolumen durch geeignete Strömungsführung in Rotation versetzt. Die in dem Luftvolumen befindlichen Partikel werden auf einen Agarstreifen aufgeschleudert, welcher sich an der zylindrischen Wand der Meßeinrichtung befindet. Anschließend wird der Agarstreifen bebrütet und wie üblich ausgezählt. Der Siebsammler arbeitet nach dem Prinzip des Mehrstufenimpaktors. Das Probenvolumen wird durch ein System von mehreren in Serie geschalteten Siebplatten angesaugt. Der Lochdurchmesser der einzelnen Siebplatten nimmt in Richtung der Strömungsführung ab und parallel zu den abnehmenden Lochdurchmessern zu. Die luftgetragenen Partikel werden aufgrund ihrer Trägheit und der immer schneller werdenden Strömung abhängig von ihrer Größe auf unterschiedlichen Siebplatten abgeschieden. Es erfolgt so eine Auftrennung der Partikel nach ihrer Größe. Beim Schlitzsammler wird das Probevolumen durch einen Schlitz angesaugt und mit einer hohen Geschwindigkeit auf eine rotierende Nährbodenplatte aufgeschleudert. Bei der Elektropräzipitation wird das Probevolumen gerichtet durch ein Hochspannungsfeld geleitet. Die elektrostatischen Kräfte sorgen hierbei für eine Abscheidung von geladenen Partikeln auf eine rotierende gegenteilig und entgegengesetzt

geladene Oberfläche. Diese Oberfläche besteht in der Regel aus einem festen Nährboden, der anschließend bebrütet und ausgezählt wird.

Bei sämtlichen genannten Verfahren müssen die Luftpartikel aufgefangen werden, beispielsweise durch Auslegen von Petrischalen mit festen Nährböden, und anschließend bebrütet werden. Diese Prozedur kann bis zu fünf Tage dauern. Danach erfolgt eine genaue Beschreibung der ausgebrüteten Kulturen und die detaillierte Auswertung der Kontaminationsbelastung der Luft zum Zeitpunkt der Probennahme. Ein direktes Zurückverfolgen der möglichen Ursachen für die Kontaminierung ist durch die zeitliche Verschiebung meist nicht mehr möglich. Die in der Zwischenzeit produzierten und kontaminierten Produkte müssen im schlimmsten Fall komplett entsorgt werden. Nachteilig an den obengenannten Verfahren ist also, daß die Probennahme aufwendig vorbereitet werden muß, die Probe anschließend mehreren Verfahrensschritten unterworfen wird, wodurch sich die Kontaminationsgefahr während des Auswerteverfahrens stark erhöht und daß die Auswertung erst nach einer bestimmten Bebrütungszeit der Kulturen, im Durchschnitt 3 bis 5 Tage, erfolgen kann. Daher sind zumeist auch keine qualitativen Messungen möglich, zumal die Qualität der Messungen vom Verhalten des Bedienungspersonals stark abhängt. Diese Verfahren setzen daher hochqualifiziertes Personal voraus und sind nur gering automatisierbar.

Die JP-A 04-304898 offenbart ein Verfahren zur Bestimmung von Mikroorganismen in gasförmigen oder flüssigen Medien, bei dem der Brechungsindex der Partikel biotischen Ursprungs mit Hilfe einer Wärmebehandlung geändert wird. Aufgrund einer Messung des

Brechnungsindexes vor sowie nach dieser Wärmebehandlung wird dann die Anzahl der Partikel biotischen Ursprungs bestimmt. Zur Wärmebehandlung wird das Medium für eine bis zehn Minuten auf 40° bis 80° C erwärmt und anschließend abgekühlt. Optimale Betriebsparameter ergeben sich bei einer Erwärmung für eine bis zwei Minuten auf 70° C. Im Ergebnis wird durch diese Behandlung das Protein der Partikel biotischen Ursprungs denaturiert und dadurch der Brechungsindex geändert. Gemäß der JP-A-04-304898 ändert sich bei dieser Wärmebehandlung die Größe der Partikel biotischen Ursprungs nicht wesentlich und kann daher nicht zur Differenzierung zwischen Partikeln biotischen und abiotischen Ursprungs verwendet werden. Weiterhin nachteilig an diesem Verfahren ist, daß die Dauer der Messungen im 10 Minuten-Bereich und damit zwar verglichen mit den oben geschilderten Verfahren aus dem Stand der Technik relativ kurz ist. Dennoch verhindert die Erwärmungsdauer von ein bis zehn Minuten und die anschließende Abkühlung seinen Einsatz als echtes on-line-Meßverfahren. Aufgrund der immer noch langen Erwärmungsdauer läßt sich lediglich ein Batchverfahren realisieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur quantitativen und qualitativen on-line-Differenzierung von biotischen und abiotischn Partikeln in einem gasförmigen Medium zu schaffen, das sehr kurze Reaktionszeiten für eine echte on-line-Messung, eine hohe Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse aufweist und einen hohen Automatisierungsgrad und eine einfache Handhabung ermöglicht.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren und die Vorrichtung nach dem Oberbegriff der Ansprüche 1 und 9

in Verbindung mit ihren kennzeichnenden Merkmalen gelöst.

Die Lösung der erfindungsmäßen Aufgabe beruht auf einer gezielten Kombination der Bestimmung der Anzahl und Größe der in einem Medium vorhandenen Partikel mit der Veränderung von Partikel biotischen Ursprungs durch eine sehr kurze Erhitzung auf hohe Temperaturen, die oberhalb von 100° C liegen. Aufgrund der hohen Temperaturen ergeben sich lediglich sehr kurze Erhitzungsdauern im Bereich von Sekundenbruchteilen bis wenigen Sekunden. Durch diese Erhitzung schrumpfen die Partikel biotischen Ursprungs, beispielsweise durch Wasserabgabe oder auch mit geringerer Bedeutung Denaturierung der Proteine, und die Größenverteilung der Partikel in dem Medium verändert sich erkennbar. Durch Auswertung dieser Veränderungen ist es möglich, den Anteil von Partikeln biotischen Ursprungs an der Gesamtpartikelbelastung des Mediums unmittelbar innerhalb von Sekunden zu bestimmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher kontinuierlich durchführbar und voll echtzeitfähig und stellt kein, wenn auch scheinbar kontinuierlich durchgeführtes, Batchverfahren wie im Stand der Technik dar. Die Reaktionszeiten für das Bedienpersonal auf Änderung in der Partikelzusammensetzung des Mediums werden drastisch verkürzt und die Meßergebnisse sehr reproduzierbar. Auch der Wirkungsgrad der Erfassung der Luftkeime ist aufgrund der hohen eingesetzten Temperaturen sehr groß.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die mit wenigen Komponenten auskommende erfindungsgemäße Vorrichtung ermöglichen einen modularen, kompakten Geräteaufbau,

eine hohe Gerätesicherheit und daher geringe Anlagenkosten sowie Betriebs- und Wartungskosten. Der Automatisierungsgrad dieser echt kontinuierlichen on-line-Messung ist sehr groß und daher ist eine einfache Handhabung des Verfahrens auch durch nicht speziell ausgebildetes Personal möglich.

Die Erfindung ermöglicht ein schnelles Reagieren auf negative Veränderungen bezüglich der partikulären Kontamination biotischen Ursprungs innerhalb gasförmiger Medien, so daß eine effektive Produktionsüberwachung und Qualitätssicherung möglich wird. Auch eine Differenzierung der Kontaminationsart innerhalb der einzelnen Kontaminationsgruppen (biotischer Ursprung bzw. abiotischer Ursprung) ist mit diesem Verfahren möglich. Es ist unmittelbar einsichtig, daß aufgrund des unterschiedlichen Wassergehaltes der Partikel biotischen Ursprungs, beispielsweise Mikroorganismen mit hohem Wassergehalt bzw. pflanzliche Sporen mit extrem niedrigem Wassergehalt, die Temperatur und die Dauer der Erhitzung der Probe gemäß den zu bestimmenden Partikeln angepaßt werden muß. Die genauen einzuhaltenden Bedingungen lassen sich jedoch durch eine einfache Versuchsreihe bestimmen.

Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden in den abhängigen Ansprüchen gegeben.

Eine besonders kurze Erhitzungsdauer sowie eine besonders starke Änderung der Größe der Partikel biotischen Ursprungs ergeben sich bei Temperaturen oberhalb von 200° C oder besser noch 400° C besonders vorteilhaft oberhalb 450° C. Viele Partikel biotischen Ursprungs ändern ihre Größe erst bei einer Er-

hitzung für wenige Sekunden auf Temperaturen oberhalb von 200 oder 400° C. Derartige kurzzeitige Hochtemperaturerhitzungen können durch Verwendung eines Röhrchens mit geringem Durchmesser, beispielsweise eine Kapillare, als Erhitzungskammer erzielt werden.

Zusätzlich zur Veränderung der Größe der Partikel biotischen Ursprungs können auch Änderungen weiterer physikalischer Partikelparameter, beipsielsweise des Brechungsindexes oder der Oberflächenstruktur der Partikel biotischen Ursprungs vor und nach der Erhitzung bestimmt und zusätzlich zur Differenzierung und Auswertung der Meßergebnisse herangezogen werden. Mit diesen Informationen kann auch eine Differenzierung innerhalb der Partikel biotischen Ursprungs weiter verbessert werden. Als Meßverfahren eignen sich hier insbesondere zur Bestimmung der Größe der Partikel Streulichtverfahren, wobei die Verwendung einer Mehrwinkelstreulichdetektion eine vollständige Beschreibung und höhere Sicherheit bei der Bestimmung dieser Eigenschaften ermöglicht.

Die Erhitzung der Probe kann vorteilhafterweise mit Hilfe eines Wärmeüberträgers beispielsweise durch Aufheizen des oben beschriebenen dünnen Rohres bzw. der oben beschriebenen dünnen Kapillare erfolgen.

Im folgenden werden einige Beispiele für das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung beschrieben.

Fig. 1 zeigt die Differenzierung der partikulären Kontaminationen in gasförmigen Medien,

Fig. 2 zeigt die nach verschiedenen Richtlinien einzuhaltenden Grenzwerte für partikuläre Kontaminationen in gasförmigen Medien,

Fig. 3 zeigt den Aufbau einer erfindungsgemäßen Vorrichtung sowie ihr Meßprinzip,

Fig. 4 zeigt den Aufbau eines erfindungsgemäßen Mehrwinkeldetektors,

Fig. 5 zeigt Meßergebnisse vor und nach Erhitzung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren,

Fig. 6 zeigt Meßergebnisse nach dem erfindungsgemäßen Verfahren,

Fig. 7 zeigt weitere Meßergebnisse nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, und

Fig. 8 zeigt weitere Meßergebnisse nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Figuren 1 und 2 wurden bereits oben beschrieben und geben die biologischen Grundlagen der Partikeldifferenzierung sowie die gesetzlichen Grenzwerte für Partikelkontaminationen in Luft wieder.

Fig. 3 zeigt eine erfindungsgemäße Vorrichtung, die zwei Streuwinkeldetektoren 1 und 2 sowie eine Erhitzungskammer 3 zur Erhitzung der Probe aufweist. Die Probe, deren Konzentration an Partikeln biotischen Ursprungs gemessen werden soll, wird durch einen Einlaß 4 in den ersten Streuwinkeldetektor 1 geleitet.

Dort werden winkelabhängig erste Signale von physikalischen Eigenschaften (wie z.B. Größe, Brechung) der in dem Medium enthaltenen Partikel erzeugt. Anschließend wird das gasförmige Medium in der Erhitzungskammer 3 erhitzt und anschließend in dem Streuwinkeldetektor 2 erneut gemessen und weitere Signale 2 ausgegeben. Nach dieser Messung wird das gasförmige Medium über den Auslaß 5 des Streuwinkeldetektors 2 aus der erfindungsgemäßen Meßvorrichtung ausgeblasen. Die beiden Diagramme in Fig. 3 zeigen die Meßsignale in Abhängigkeit von der Detektorspannung. Dies entspricht der Größenverteilung der Partikel in der Probe. Fig. 3 zeigt nun, wie sich die Größenverteilung durch die Erhitzung des Gases in der Erhitzungskammer 3 verändert. Dabei stellen die beiden Diagramme die Signale der Streuwinkeldetektoren 1 und 2 unter verschiedenen Streuwinkeln dar. Damit wird zugleich gezeigt, daß das Signal sowie seine Veränderung selbstverständlich von dem Winkel, unter dem das Streulicht beobachtet wird, abhängt. Weiterhin hängt die Streuung selbstverständlich auch von dem zur Erzeugung der von Streulicht auf das gasförmige Medium eingestrahlten Meßlicht ab.

Fig. 4 zeigt einen erfindungsgemäßen Mehrwinkelstreulichtdetektor 1 mit einem Gaseinlaß 4, einem Gasauslaß 8 sowie drei Streulichteinzeldetektoren 10, 11 und 12, die entlang des Umfangs einer Meßkammer 9 angeordnet sind. Der erfindungsgemäße Mehrwinkelstreulichdetektor 1 weist weiterhin eine Laserlichtquelle 6 auf, die einen Laserstrahl 7 erzeugt. Der Laserstrahl 7 trifft an einer Meßstelle 13 auf den vom Einlaß 4 zum Auslaß 8 strömenden Gasstrom und erzeugt dort Streulicht, das unter drei verschiedenen Winkeln, die durch Pfeile eingezeichnet sind, durch

die drei Detektoren 10, 11 und 12 erfaßt wird. Mit Hilfe dieser unterschiedlichen Detektionswinkel können parallel materialunabhängige (Beugung) und materialabhängige (Brechung, Reflexion) physikalische Eigenschaften erfaßt werden. Durch die Verwendung eines derartigen Mehrwinkeldetektors, der gleichzeitig das Streulichtsignal in mehreren unterschiedlichen, für die Erkennung einzelner physikalischer Effekte geeigneten Winkeln aufnimmt, kann somit eine differenzierte Aussage über die erzielten Veränderungen nicht nur der Größe sondern beispielsweise auch der Formoberfläche oder des Brechungsindexes getroffen werden. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren spielt jedoch die durch eine Erhitzung erzeugte Veränderung der Größe der Partikel die wesentliche Rolle.

Durch die Verwendung von zwei baugleichen Mehrwinkelstreulichtdetektoren zur Bestimmung der Größe der Partikel vor bzw. nach einer Erhitzung auf hohe Temperaturen wird eine Differenzmessung realisiert und die Unterscheidung von Kontaminationen biotischen und abiotischen Ursprungs ermöglicht. Das Ergebnis der Differenzmessung ergibt eine Aussage über die jeweilige Anzahl von Partikeln biotischen und abiotischen Ursprungs in der zu vermessenden Gasprobe. Dies findet seine Ursache darin, daß partikuläre Kontaminationen abiotischen Ursprungs keine Abhängigkeit der Größenverteilung von der Erhitzung zeigen. Daher sind Unterschiede der Messungen vor bzw. nach Erhitzung der Gasprobe ein Maß für die Partikelkontaminationen biologischen Ursprungs und ermöglichen so die genaue Bestimmung der Anzahl Partikel biotischen Ursprungs in der Gasprobe und damit einen direkten Rückschluß

auf die Belastung des Mediums beispielsweise mit Luftkeimen.

Fig. 5 zeigt modellhaft die Veränderung der Partikelgrößenverteilung durch eine Erhitzung einer Gasprobe auf 450° C für wenige Sekunden. Fig. 5A zeigt die Häufigkeit n an, mit der Partikel mit einem Durchmesser d in der nicht erhitzten Probe, d.h. in dem Detektor 1 auftreten. Fig. 5B zeigt die entsprechende Häufigkeitsverteilung der Partikelgrößen derselben Gasprobe in dem Detektor 2, d.h. nach Erhitzung des Probenvolumens. Fig. 5C zeigt die Differenz zwischen den beiden beschriebenen Häufigkeitsverteilungen. Es ist leicht ersichtlich, daß die Größe der Partikel biotischen Ursprungs durch die Erhitzung abgenommen hat, so daß der Anteil kleinerer Partikel zugenommen und der Anteil großer Partikel abgenommen hat. Aus dieser Änderung läßt sich nun auf einfache Art und Weise auf die Gesamtzahl der Partikel biotischen Ursprungs in der ursprünglichen Luftprobe schließen.

Fig. 6 zeigt die Abhängigkeit der Größenänderung der Partikel biotischen Ursprungs von der Erhitzungstemperatur. Für diese Messungen wurde eine Mischung aus Micrococcus luteus und Latexpartikeln mit einem Durchmesser von 0,74 μm mit einem Mischungsverhältnis von 1 : 1 bei verschiedenen Temperaturen erhitzt. Das dargestellte Diagramm zeigt das Streulichtsignal unter einem Streuwinkel von 20° in Abhängigkeit von der Detektorspannung. Dies entspricht der oben geschilderten Häufigkeitsverteilung der Partikelgrößen. Es ist unmittelbar zu sehen, daß lediglich bei einer Erhitzung über 400° C die Größe der Micrococcus luteus-Organismen sich drastisch verringert. Erst bei diesen hohen Erhitzungstemperaturen nimmt der bei

einer geringen negativen Detektorspannung erfaßte großvolumige Partikelanteil stark ab und es entsteht eine scharfe Häufigkeitsspitze bei hohen Detektorspannungen, d. h. bei kleinen Partikelgrößen. Diese bei hohen Temperaturen oberhalb 400° C auftretende Spitze entspricht den durch die Erhitzung in ihrer Größe stark geschrumpften Micrococcus luteus-Mikroorganismen, während die Latexpartikel durch die Erhitzung keine Veränderung ihrer Größe erfahren haben. Dieses Temperaturverhalten bestätigt auch, daß die Änderungen des Streulichtsignals im wesentlichen nicht Änderungen des Brechungsindexes aufgrund von Denaturierung der Proteine der Partikel biotischen Ursprungs widerspiegeln, da in diesem Falle bereits ab ca. 60 °C eine Signaländerung zu erwarten wäre.

Fig. 7 zeigt die Veränderung der Größenverteilungen von Micrococcus luteus-Mikroorganismen durch Erhitzung bei unterschiedlichen Temperaturen. Dabei ist Fig. 7A unter einem Streuwinkel von 20°, Fig. 7B unter einem Streuwinkel von 55° und Fig. 7C unter einem Streuwinkel von 90° aufgenommen. Es ist unmittelbar zu sehen, daß die beobachteten Signalveränderungen von dem Beobachtungswinkel abhängen. Weiterhin ist jedoch allen drei Kurven 7A bis 7C zu entnehmen, daß erst bei Temperaturen von über 400° C eine merkliche Veränderung des Signals auftritt. Eine deutliche Veränderung des Signals, die sich für eine Auswertung hervorragend eignet, tritt erst bei Temperaturen um 450° C auf.

Fig. 8 zeigt ein weiteres Beispiel, bei dem das Streulichtsignal von Bazillus subtilis - Sporen unter einem Winkel von 20° nach Erhitzung auf verschiedene Temperaturen gemessen wurde. Obwohl Bazil-

lus subtilis-Sporen einen sehr geringen Wassergehalt haben, läßt sich bei einer Erhitzung auf 400° C oder besser noch auf 450° C eine deutliche Änderung des Streulichtsignales, d. h. der Größenverteilung der Partikel beobachten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit der vorliegenden Erfindung ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Verfügung gestellt wird, bei dem die Partikelkonzentration biotischen Ursprungs von der Partikelkonzentration abiotischen Ursprungs unterschieden und die Belastungen gasförmiger Medien durch Partikel biotischen Ursprungs sehr rasch, on-line und kontinuierlich bestimmt werden können. Dies beruht im wesentlichen auf der durch eine kurzzeitige Erhitzung auf sehr hohe Temperaturen verursachten Größenänderung der Partikel biotischen Ursprungs.

Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen und qualitativen online-Differenzierung von biotischen und abiotischen Partikeln in einem gasförmigen Medium, dadurch gekennzeichnet, daß in einer ersten Meßeinrichtung (1) die Anzahl und Größe der in dem gasförmigen Medium vorhandenen Partikel bestimmt, das gasförmige Medium für kurze Zeit auf Temperaturen oberhalb 100° C erhitzt, in einer zweiten Meßeinrichtung (2) die Anzahl und Größe der in dem erhitzten gasförmigen Medium vorhandenen Partikel bestimmt und
aus den Ergebnissen der ersten und der zweiten Bestimmung die Anzahl und/oder Größe der biotischen und abiotischen in dem gasförmigen Medium vorhandenen Partikel ermittelt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium für wenige Sekunden auf Temperaturen oberhalb 200° C erhitzt wird.

3. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium für wenige Sekunden auf Temperaturen oberhalb 400° C erhitzt wird.

4. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß außer der Größenverteilung zugleich weitere physikalische Partikelparameter, beispielsweise die Verteilung des Brechungsindexes der Partikel, bestimmt werden.

5. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren auf einen kontinuierlichen Strom gasförmigen Mediums angewandt wird.

6. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erhitzung das gasförmige Medium durch ein dünnes, erhitztes Röhrchen (3) oder Kapillare geleitet wird.

7. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Verteilung der Größe und/oder des Brechungsindexes der Partikel in dem gasförmigen Medium mittels eines Streulichtverfahren bestimmt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß unter mindestens zwei verschiedenen Winkel das von den Partikeln ausgehende Streulicht (Mehrwinkeldetektion) erfaßt wird.

9. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß ein erster und ein zweiter Streulichtpartikelzähler (1, 2) mit je einem Einlaß (4) sowie einem Auslaß (5, 8) für gasförmige Medien sowie eine Erhitzungskammer (3) vorgesehen sind, wobei der Probenauslaß des ersten Streulichtpartikelzählers und der Probeneinlaß des zweiten Streulichtpartikel das gasförmige Medium durch die Erhitzungskammer (3) leitend miteinander verbunden sind.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Streulichtpartikelzähler (1, 2) Mehrwinkeldetektoren sind.

11. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhitzungskammer (3) ein dünnes Rohr mit einer Temperatur oberhalb 100° C aufweist.

12. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Rohr eine Temperatur oberhalb 200° C aufweist.

13. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Rohr eine Temperatur oberhalb 400° C aufweist.

14. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Rohr eine Kapillare ist.

15. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß an dem Rohr eine Wärmequelle angeordnet ist.

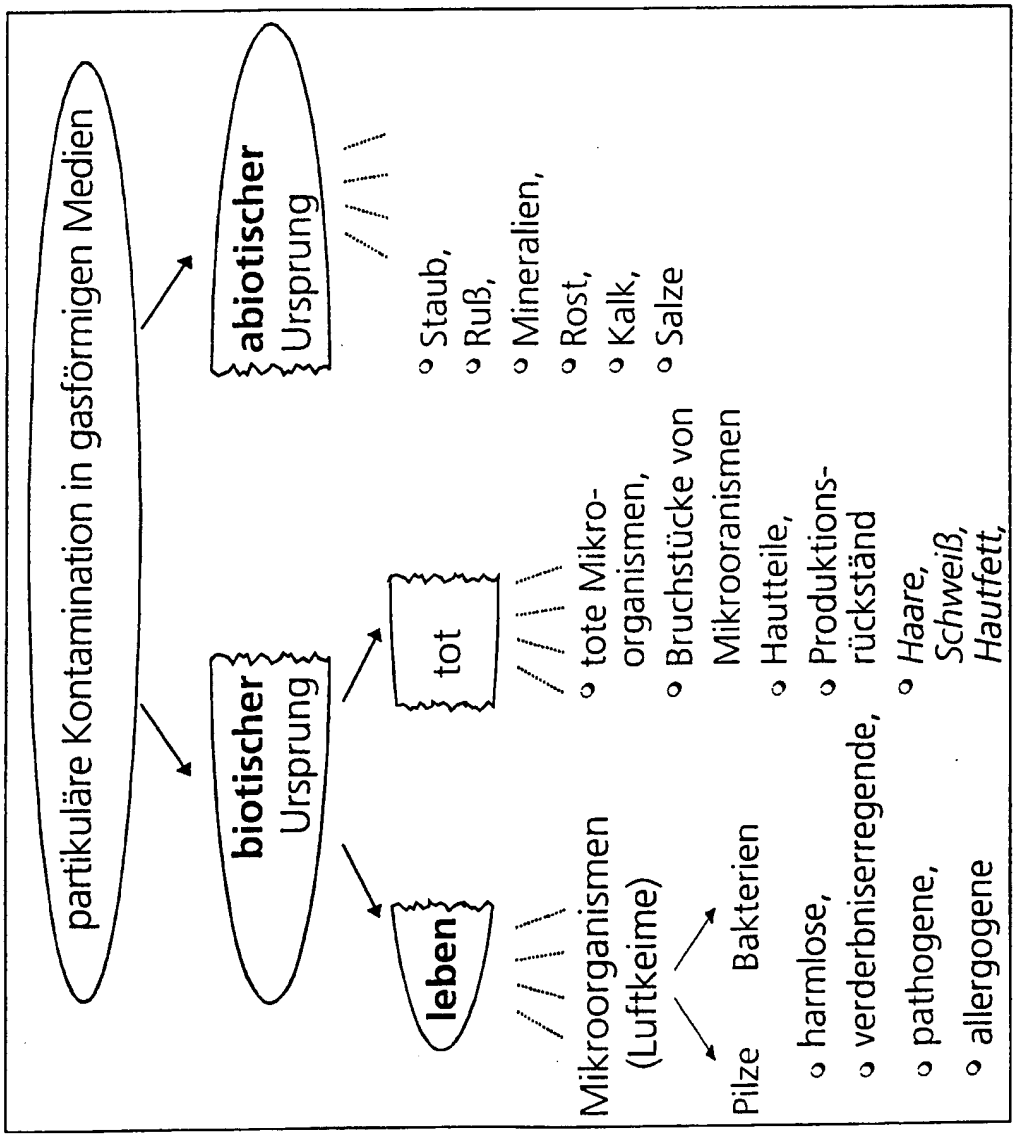

partikuläre Kontamination in gasförmigen Medien
biotischer Ursprung
leben
Mikroorganismen (Luftkeime)
Pilze
Bakterien
harmlose,
verderbniserregende,
pathogene,
allergogene
tot
tote Mikro-organismen,
Bruchstücke von Mikrooranismen
Hautteile,
Produktions-rückstand
Haare,
Schweiß,
Hautfett,
abiotischer Ursprung
Staub,
Ruß,
Mineralien,
Rost,
Kalk,
Salze

Fig. 1

Reinheits-klasse	Bemerkung	Maximal erlaubte Partikelzahl pro m³		Maximal erlaubte Luftkeimzahl pro m³
		> 0,5 µm	> 5 µm	
A	laminare Luftströmung	3.500	0	**< 1**
B	turbulente Luftströmung	3.500	0	**5**
C	turbulente Luftströmung	350.000	2.000	**100**
D	turbulente Luftströmung	3.500.000	20.000	**500**

Fig. 2

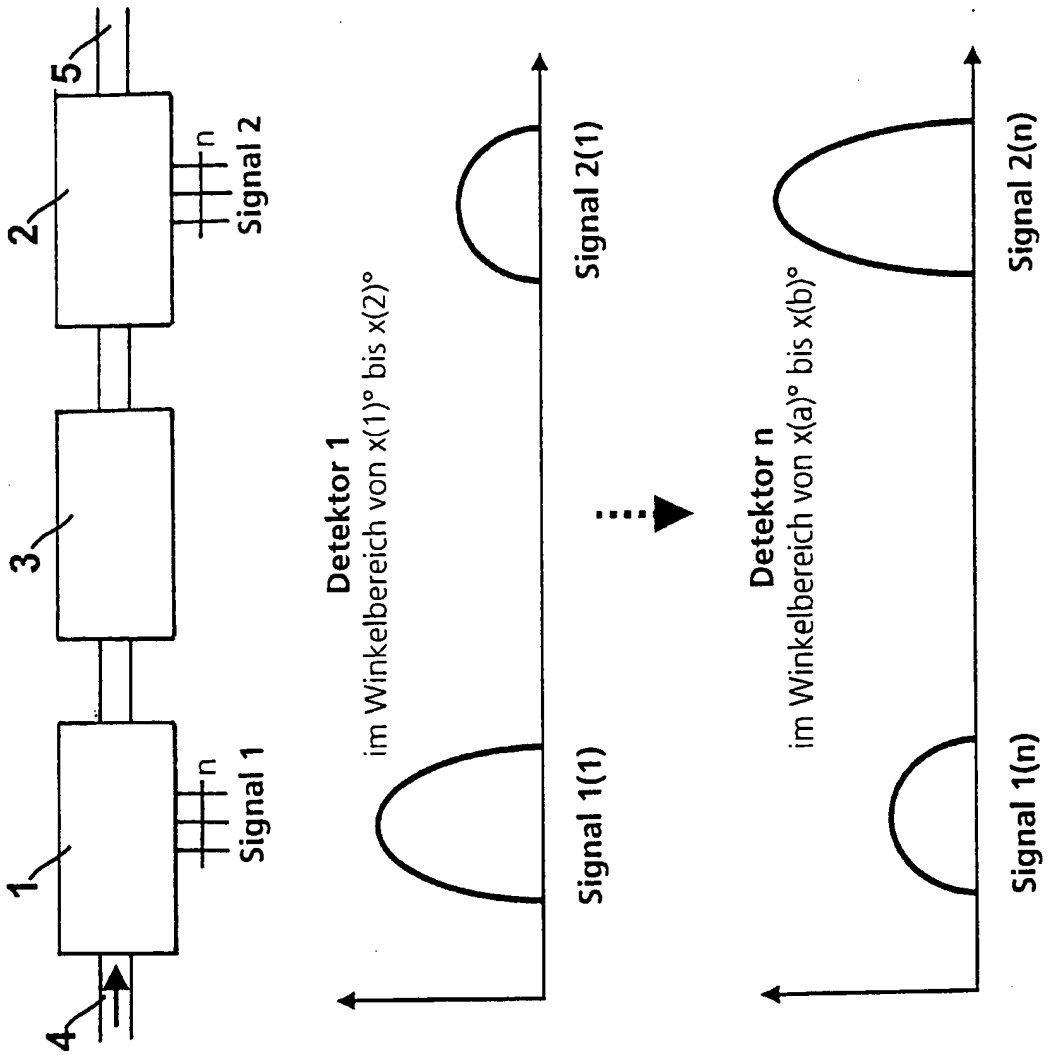

1
2
3
4
5
n
Signal 1
n
Signal 2
Detektor 1
im Winkelbereich von x(1)° bis x(2)°
Signal 1(1)
Signal 2(1)
Detektor n
im Winkelbereich von x(a)° bis x(b)°
Signal 1(n)
Signal 2(n)

Fig. 3

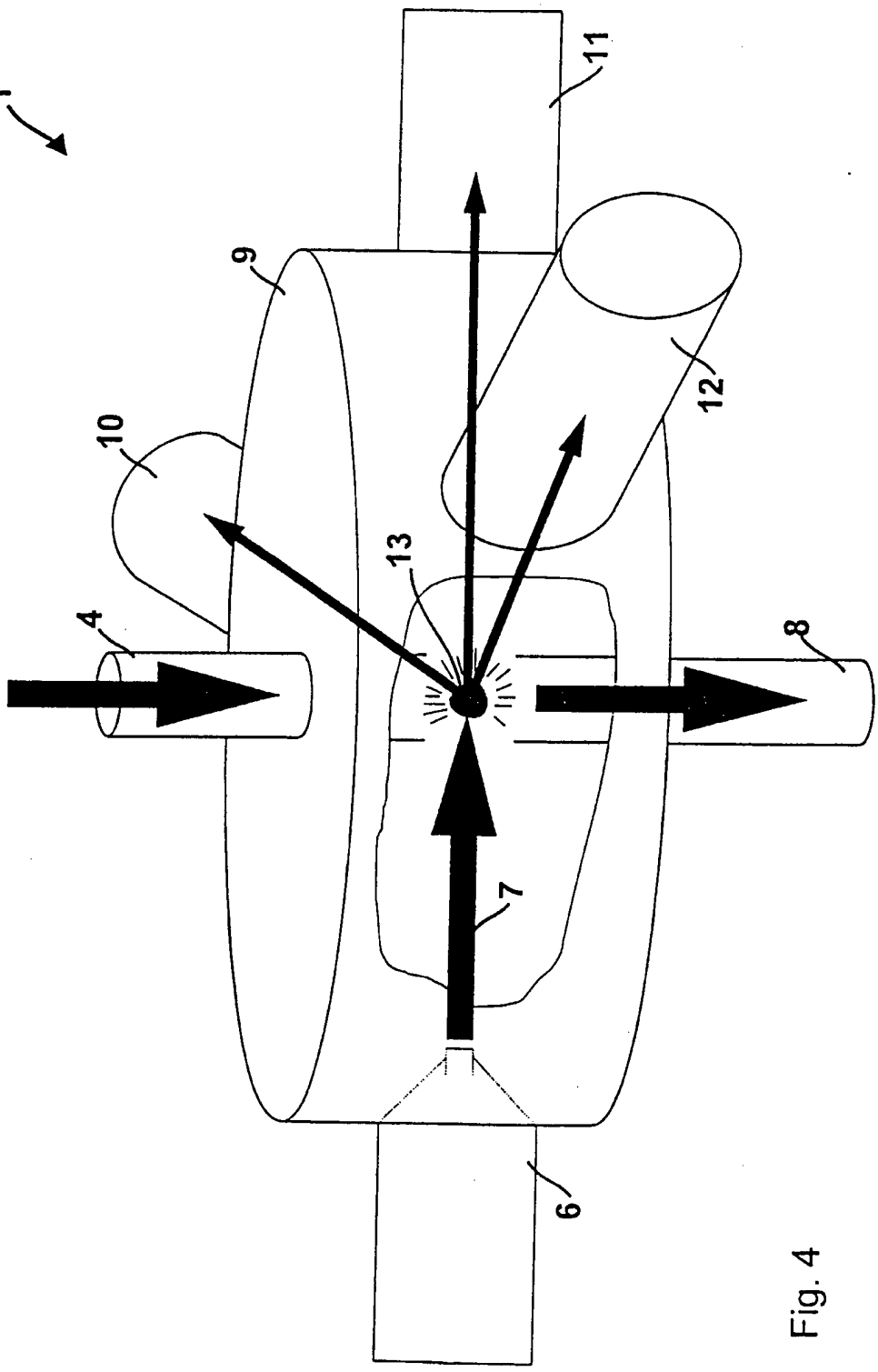


Fig. 4

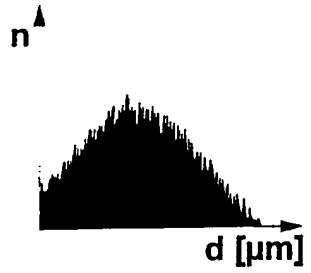


Fig. 5A

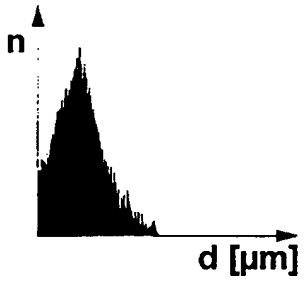


Fig. 5B

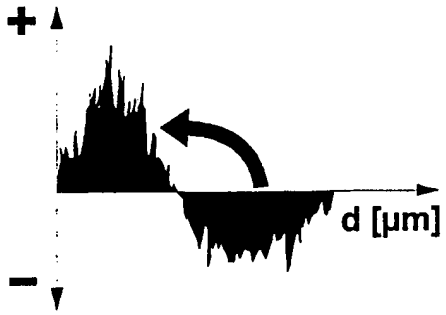


Fig. 5C

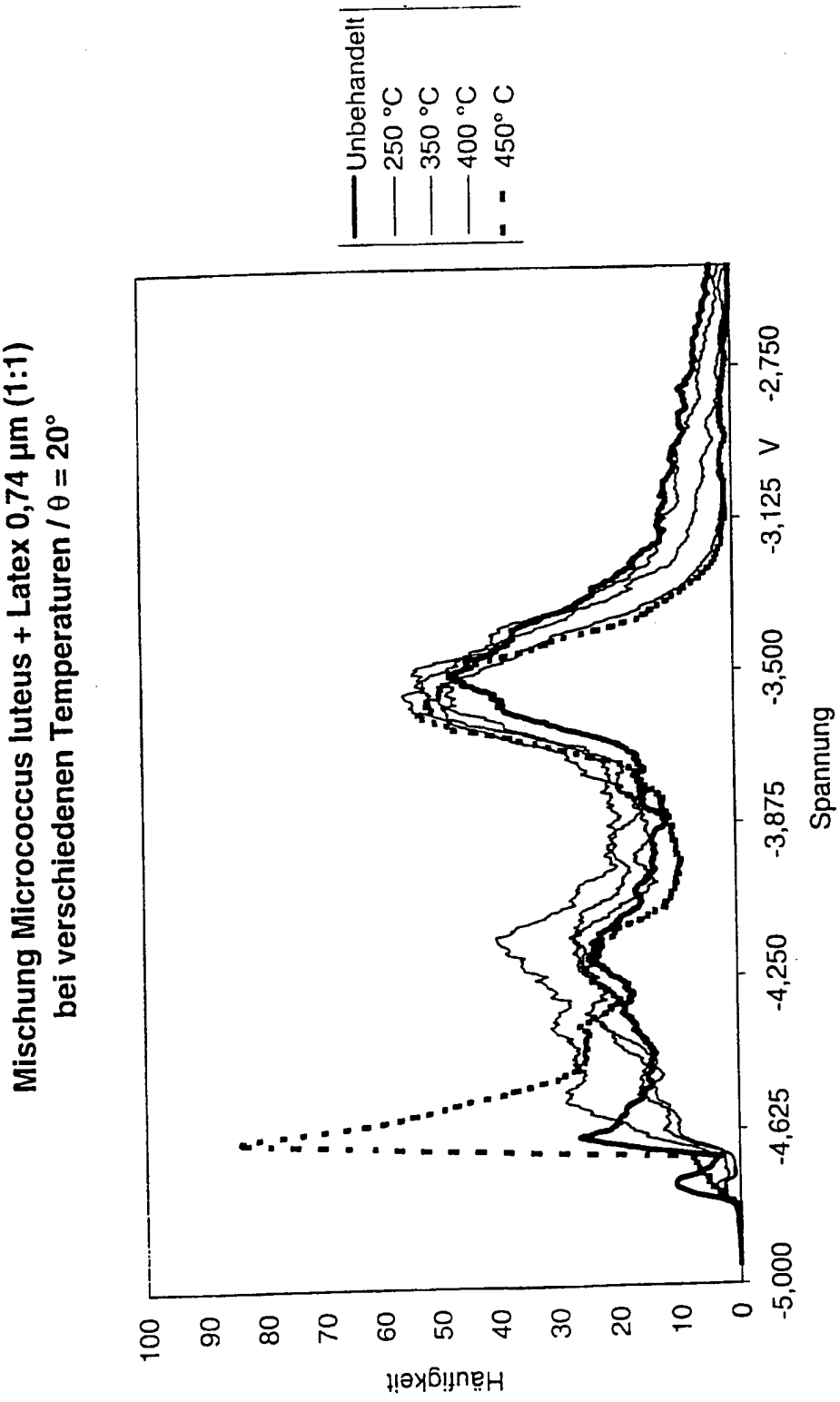

Mischung Micrococcus luteus + Latex 0,74 µm (1:1)
bei verschiedenen Temperaturen / θ = 20°
Unbehandelt
250 °C
350 °C
400 °C
450° C
Häufigkeit
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-5,000
-4,625
-4,250
-3,875
-3,500
-3,125
V
-2,750
Spannung

Fig. 6

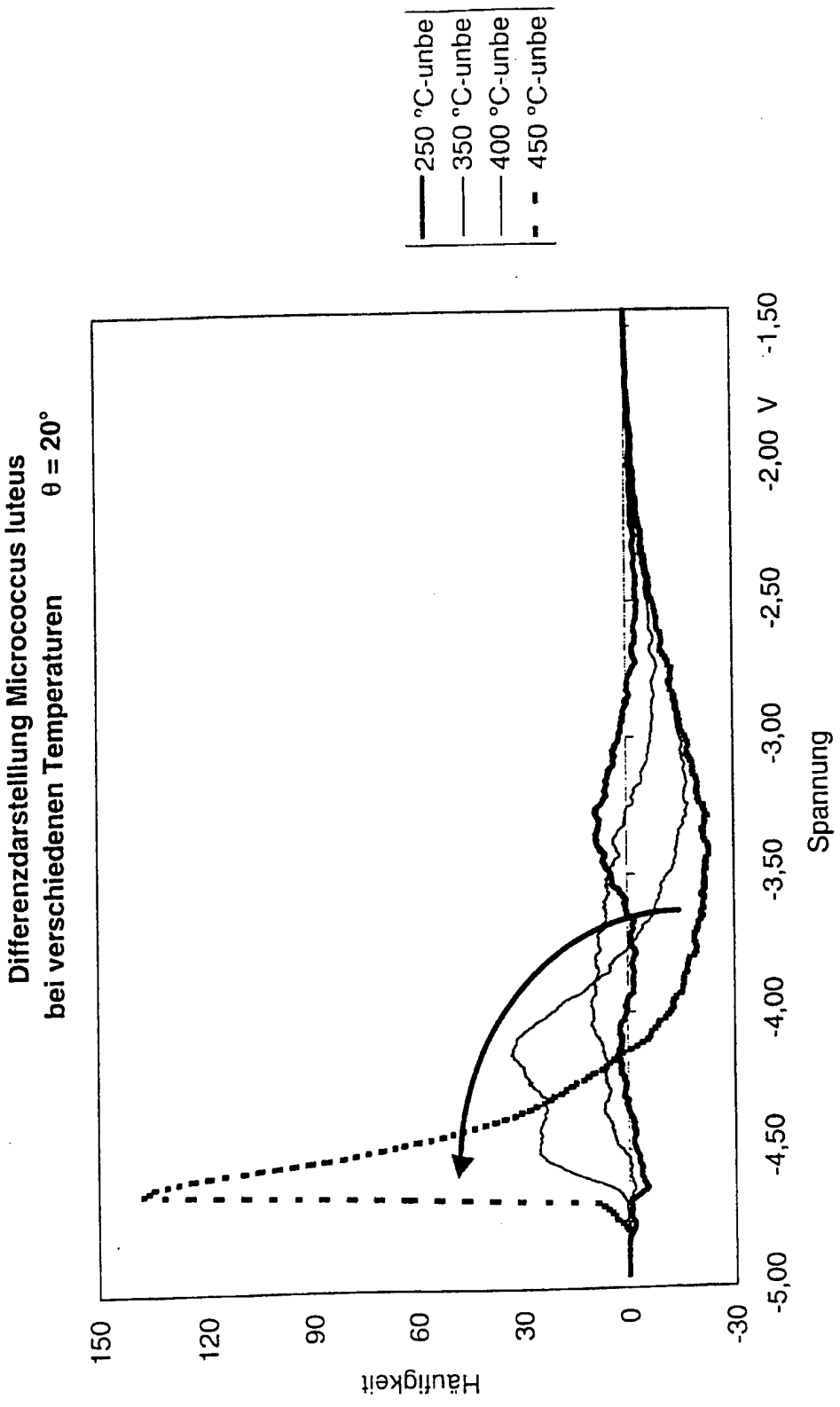

Differenzdarstellung Micrococcus luteus
bei verschiedenen Temperaturen θ = 20°
250 °C-unbe
350 °C-unbe
400 °C-unbe
450 °C-unbe
Häufigkeit
150
120
90
60
30
0
-30
-5,00
-4,50
-4,00
-3,50
-3,00
-2,50
-2,00 V
-1,50
Spannung

Fig. 7A

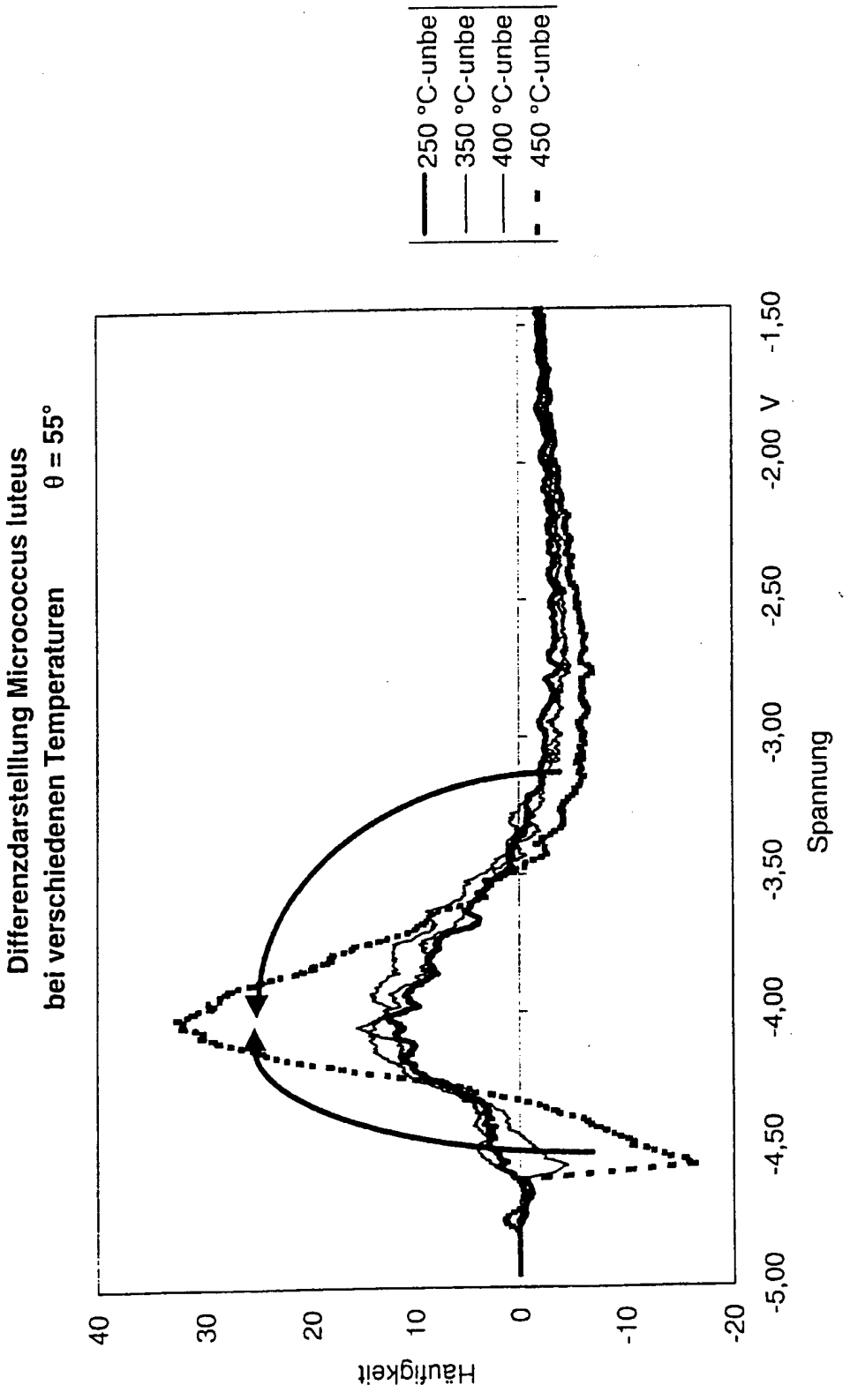

Differenzdarstelllung Micrococcus luteus
bei verschiedenen Temperaturen θ = 55°
250 °C-unbe
350 °C-unbe
400 °C-unbe
450 °C-unbe
Häufigkeit
40
30
20
10
0
-10
-20
-5,00
-4,50
-4,00
-3,50
-3,00
-2,50
-2,00 V
-1,50
Spannung

Fig. 7B

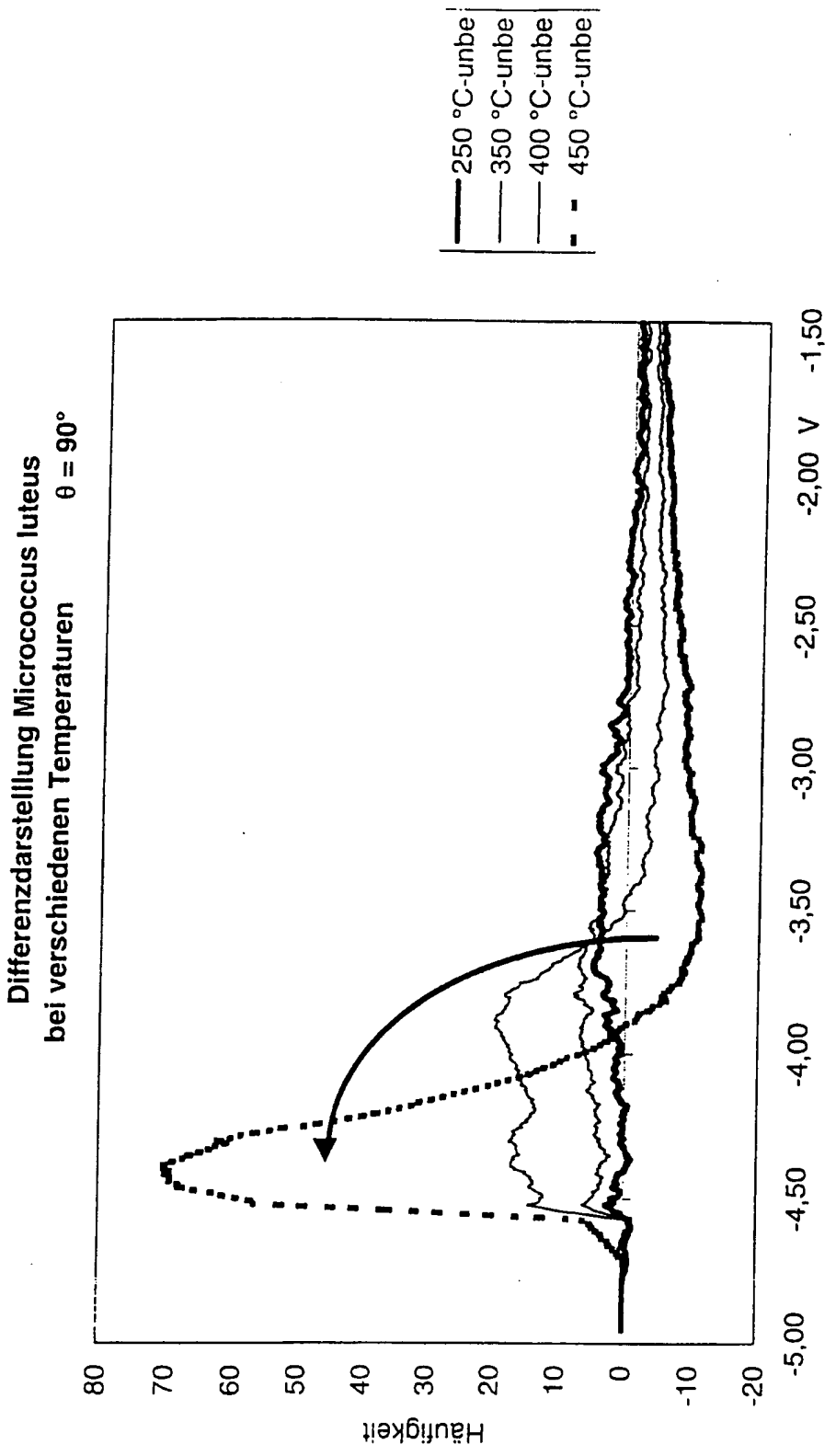

Differenzdarstelllung Micrococcus luteus
bei verschiedenen Temperaturen θ = 90°
250 °C-unbe
350 °C-unbe
400 °C-unbe
450 °C-unbe
Häufigkeit
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-5,00
-4,50
-4,00
-3,50
-3,00
-2,50
-2,00 V
-1,50
Spannung

Fig. 7C

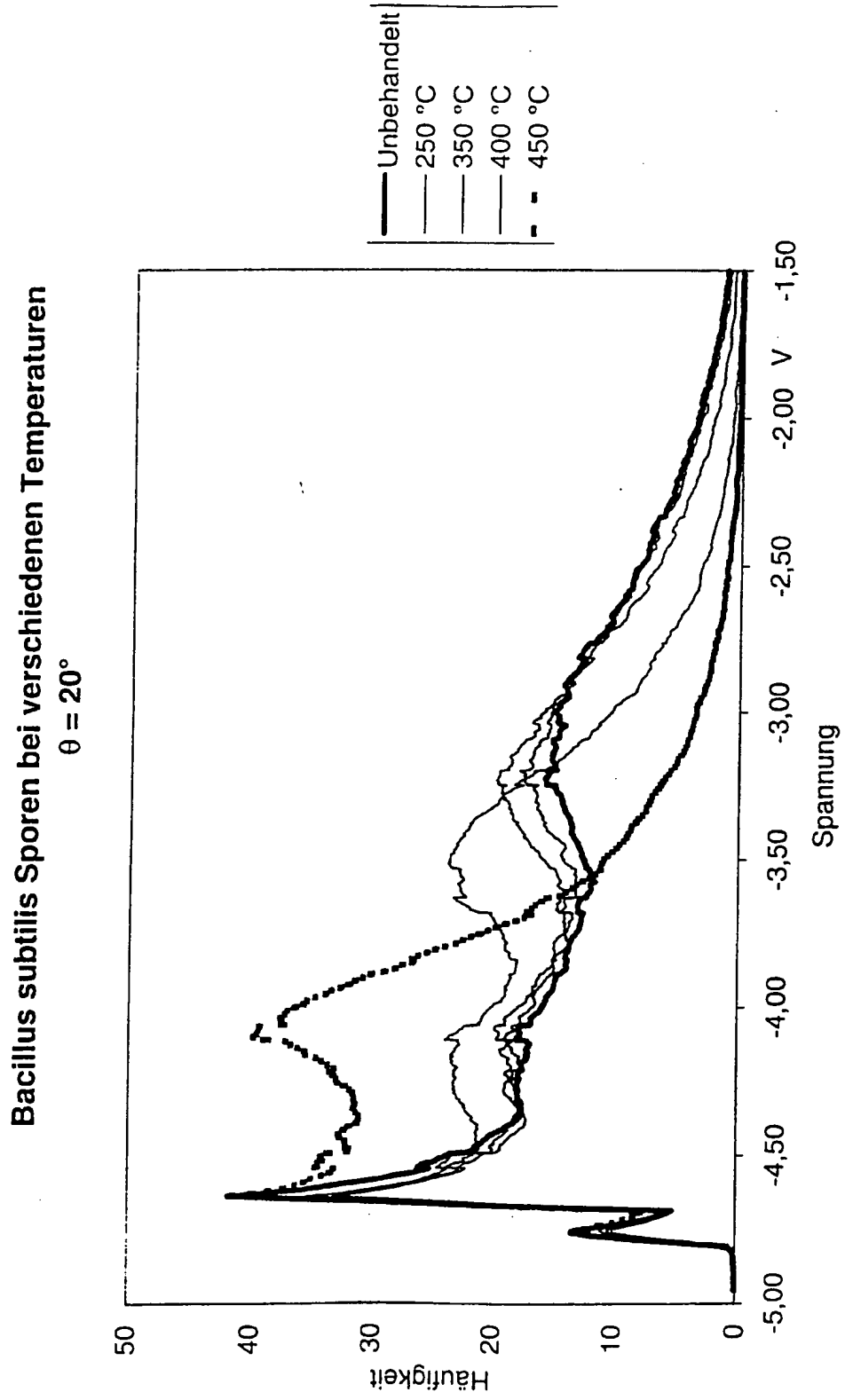

Bacillus subtilis Sporen bei verschiedenen Temperaturen
θ = 20°
Unbehandelt
250 °C
350 °C
400 °C
450 °C
Häufigkeit
0
10
20
30
40
50
-5,00
-4,50
-4,00
-3,50
-3,00
-2,50
-2,00
-1,50
V
Spannung

Fig. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

'ernational Application No
PCT/EP 98/02239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N15/02

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimumdocumentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 670 137 A (KOSEKI YASUO ET AL) 2 June 1987 see column 2, line 53-68; figure 1 see column 5, line 57 - column 6, line 3 see column 6, line 42 - column 7, line 8; figure 7	1,9
A	US 4 541 719 A (WYATT PHILIP J) 17 September 1985 see column 9, line 59 - column 10, line 14	1,9
A	US 4 605 535 A (DIMPFL WILLIAM L) 12 August 1986 see abstract	1,9
A	US 5 401 468 A (PATASHNICK HARVEY ET AL) 28 March 1995 see abstract	1,9

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publicationdate of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of theinternational search	Date of mailing of the international search report
7 September 1998	15/09/1998

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Zinngrebe, U

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

ernational Application No
PCT/EP 98/02239

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4670137 A	02-06-1987	NONE	
US 4541719 A	17-09-1985	DE 3377013 A	14-07-1988
		EP 0102726 A	14-03-1984
US 4605535 A	12-08-1986	US 4486535 A	04-12-1984
US 5401468 A	28-03-1995	US 5279970 A	18-01-1994
		US 5196170 A	23-03-1993
		US 5110747 A	05-05-1992
		AT 160217 T	15-11-1997
		DE 69223160 D	18-12-1997
		DE 69223160 T	09-04-1998
		EP 0638166 A	15-02-1995
		JP 7505218 T	08-06-1995
		WO 9322654 A	11-11-1993
		AT 162625 T	15-02-1998
		CA 2089758 A,C	14-05-1992
		DE 69128794 D	26-02-1998
		DE 69128794 T	10-06-1998
		EP 0558628 A	08-09-1993
		JP 7058264 B	21-06-1995
		WO 9208968 A	29-05-1992

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/02239

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N15/02

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 670 137 A (KOSEKI YASUO ET AL) 2. Juni 1987 siehe Spalte 2, Zeile 53-68; Abbildung 1 siehe Spalte 5, Zeile 57 - Spalte 6, Zeile 3 siehe Spalte 6, Zeile 42 - Spalte 7, Zeile 8; Abbildung 7 ---	1,9
A	US 4 541 719 A (WYATT PHILIP J) 17. September 1985 siehe Spalte 9, Zeile 59 - Spalte 10, Zeile 14 ---	1,9
A	US 4 605 535 A (DIMPFL WILLIAM L) 12. August 1986 siehe Zusammenfassung --- -/--	1,9

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
7. September 1998	15/09/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Zinngrebe, U

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ɜrnationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/02239

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 401 468 A (PATASHNICK HARVEY ET AL) 28. März 1995 siehe Zusammenfassung -----	1,9

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

'ernationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/02239

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
US 4670137	A	02-06-1987	KEINE			
US 4541719	A	17-09-1985	DE	3377013	A	14-07-1988
			EP	0102726	A	14-03-1984
US 4605535	A	12-08-1986	US	4486535	A	04-12-1984
US 5401468	A	28-03-1995	US	5279970	A	18-01-1994
			US	5196170	A	23-03-1993
			US	5110747	A	05-05-1992
			AT	160217	T	15-11-1997
			DE	69223160	D	18-12-1997
			DE	69223160	T	09-04-1998
			EP	0638166	A	15-02-1995
			JP	7505218	T	08-06-1995
			WO	9322654	A	11-11-1993
			AT	162625	T	15-02-1998
			CA	2089758	A,C	14-05-1992
			DE	69128794	D	26-02-1998
			DE	69128794	T	10-06-1998
			EP	0558628	A	08-09-1993
			JP	7058264	B	21-06-1995
			WO	9208968	A	29-05-1992